

学位論文の内容の要約

氏名	セーボレー 那沙
学位の種類	博士(工学)
学府又は研究科・専攻	大学院工学府 生命工学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	Aptamer <i>in silico</i> maturation 法の開発 - <i>in vitro</i> の機能評価と <i>in silico</i> の配列組み換えに基づくアプタマーの機能改良

【論文の内容の要約】

本研究では、遺伝的アルゴリズムに基づき *in vitro* の機能評価と *in silico* の配列組み換えを通してアプタマーの機能改良を行う手法を aptamer *in silico* maturation 法として再定義し、その一般性と応用可能性を示すことを目的とした。*in vitro* の機能評価が特長である本手法において、機能改良の対象となるアプタマーの配列多様性を制限せずに配列組み換えの効果について検証し、遺伝的アルゴリズムに基づく方法論の一般性を示すことを目指した。さらに、*in vitro* の機能評価プロセスの利点に着目し、細菌のようにアプタマーとの結合に関して予測できない要素が多い標的を対象にアプタマーの機能改良を行い、本手法の応用範囲を検討した。

本論文は以下の5章から構成されている。

第1章では、アプタマーの標準的な探索手法である試験管内進化法 (SELEX) の原理的な問題点について整理し、高い結合能や特異性を示すアプタマーの開発における課題を述べた。そして、アプタマーの機能改良に関する知見を整理し、アプタマー開発の方法論についてまとめた。さらに、遺伝的アルゴリズムを応用したペプチドリガンドやタンパク質の開発について延べ、アプタマー開発における遺伝的アルゴリズムの応用について背景を整理した。そして、遺伝的アルゴリズムの方法論に基づき *in vitro* の機能評価と *in silico* の配列組み換えを通してアプタマーを開発する手法を aptamer *in silico* maturation として再定義し、本手法の検討すべき課題を明らかにした上で、本研究の目的と意義について述べた。

第2章では、アプタマーの標的を前立腺特異抗原 (PSA) とし、*in silico*

maturation によるアプタマーの PSA 結合能の改良を試みた。配列相同性の異なる親配列からの機能改良を通して、*in silico* における配列交叉の効果について考察し、遺伝的アルゴリズムに基づく方法論の一般性を示すことを目的とした。SELEX で取得した配列の異なる 5 種類のアプタマーを親配列とし、4 世代の *in silico* maturation を行った結果、親配列と比較して 48 倍にまで PSA 結合能の改良に成功した。そして、*in silico* maturation の過程で、PSA との結合に重要だと考えられる有効な部分配列の組み合わせが生じたことを示し、本手法における配列交叉の効果について考察した。改良したアプタマーは、結合解離定数 (K_D) 数十 nM で PSA に特異的な結合を示した。そして、アプタマーを用いて 40~100 nM の濃度範囲で PSA の検出に成功し、開発したアプタマーの PSA 検出への応用の可能性を示した。本章の結果から、配列モチーフを制限せずに *in silico* maturation を行い、遺伝的アルゴリズムに基づく配列操作がアプタマー改良において有効であることを例証し、本手法の一般性を示した。

第 3 章では、細菌結合アプタマーの探索手法として Cell-SELEX 法を検討した。尿路感染症細菌である *Escherichia coli* NSM59 及び *Proteus mirabilis* B4 を標的として Cell-SELEX を行い、それぞれの細菌に結合するアプタマーを探索した。*E. coli* NSM59 を標的とした 5 ラウンドの Cell-SELEX の結果、グアニン塩基に富む配列を取得し、*E. coli* NSM59 に特異的に結合することを示した。一方、*P. mirabilis* B4 について、6 ラウンドの Cell-SLEEX 後に取得したアプタマーは、 $K_D \leq 10$ nM で高い結合能を示したのに対し、結合の特異性が低いことが明らかになった。以上の結果から、SELEX に基づく手法のみでは、細菌に特異的に結合するアプタマーの獲得が難しい場合があることを確認し、細菌結合アプタマーの特異性を改良する必要性を示した。

第 4 章では、Cell-SELEX で取得した *P. mirabilis* 結合アプタマーに *in silico* maturation を適用し、*P. mirabilis* に対する結合の特異性を改良した。配列パターンが保存された 5 本の親配列から *in silico* maturation を開始し、*P. mirabilis* に対する結合シグナルと *E. coli* に対する結合シグナルの比を特異性の指標 (specificity index, SI 値) としてアプタマーの改良を進めた。*in silico* maturation の結果、第 2 世代までに SI 値が 36% 向上したアプタマーの獲得に成功し、本手法でアプタマーの特異性を改良できることを示した。本章の結果から、細菌のようにアプタマーの結合標的を予測しきれない複雑な対象であっても、*in vitro* で個々の配列の機能評価を行う *in silico* maturation が有効な機能改良法であることを示し、本手法の応用可能性を示した。

第 5 章では本研究を総括し、本研究成果の意義、及び aptamer *in silico* maturation の展望を述べた。